天冬酰胺对脂多糖刺激断奶仔猪生产性能以及下丘脑-垂体-肾上腺轴 Toll 样受体 4 和核苷酸结合寡聚化结构域信号通路的影响[1]

陈会甫　皮定安　冷炜博　王秀英　朱惠玲　刘玉兰　康　萍*

（武汉轻工大学动物营养与饲料科学湖北省重点实验室，武汉　430023）

摘　要：本试验旨在研究天冬酰胺（Asn）对脂多糖（LPS）刺激断奶仔猪生产性能和下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴的 Toll 样受体 4（TLR4）和核苷酸结合寡聚化结构域（NOD）信号通路关键基因 mRNA 表达的影响。试验选取 24 头健康的（21±2）日龄“杜×长×大”断奶仔猪[（8.12±0.56） kg]，按体重相近原则随机分为 4 组，分别为：1）对照组（基础饲粮）；2）LPS 组（基础饲粮+LPS）；3）LPS+0.5% Asn 组（基础饲粮+0.5%Asn+LPS）；4）LPS+1.0% Asn 组（基础饲粮+1.0% Asn+LPS）。每组 6 个重复，每个重复 1 头猪。试验第 20 天，LPS 组、LPS+0.5% Asn 组和 LPS+1.0% Asn 组的试验猪注射 100 μg/kg BW 的 LPS，对照组试验猪则注射等量的生理盐水。试验期为 20 d。结果表明，与对照组相比，LPS 刺激以及饲粮中添加 Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪的生长性能没有显著影响（*P*>0.05）。LPS 刺激可以显著提高 HPA 轴中 *TLR*4、髓样分化蛋白 88（*MyD*88）、*NOD*2、受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2（*RIP*2）和核转录因子-κB（*NF-κB*）的 mRNA 表达量（*P*<0.05）。饲粮中添加 Asn 可以显著降低下丘脑中 *NF-κB* 的 mRNA 表达量（线性，*P*<0.05），并有降低肾上腺中 *TLR*4 和 *NOD*2 的 mRNA 表达量的趋势（线性，*P*<0.10）。此外，饲粮中添加 Asn

---

收稿日期：2018-05-07

基金项目：湖北省教育厅科学研究计划指导性项目（B2016076）；湖北省教育厅优秀中青年科技创新团队项目（T201508）

作者简介：陈会甫（1993-），男，湖北咸宁人，硕士研究生，从事动物营养研究。E-mail: 1069902536@qq.com

*通信作者：康　萍，副教授，硕士生导师，E-mail: ylkp2003@163.com

可以显著降低垂体中肿瘤坏死因子受体相关因子6（*TRAF*6）的mRNA表达量（二次，$P<0.05$），显著增加了肾上腺中 *RIP*2 的 mRNA 表达量（线性，$P<0.05$；二次，$P<0.05$）。由此可见，Asn 虽然对 LPS 刺激仔猪的生长性能没有影响，但可能通过降低下丘脑 *NF-κB* 的 mRNA 表达量，而对下丘脑 TLR4 信号通路具有一定的抑制作用。

关键词：天冬酰胺；脂多糖；断奶仔猪；下丘脑-下垂体-肾上腺轴；TLR4；NOD

中图分类号：S828

在现代化养猪业中，早期断奶仔猪容易受到饲养环境中的一系列不良因素的影响，如细菌、病毒等的刺激，从而发生免疫应激。在免疫应激状态下，免疫系统会产生大量的炎性细胞因子，如肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-6 和 IL-1 等，会导致组织（如肠道和肝脏）的损伤[1]，并最终导致动物生长性能下降。因此，通过营养调控手段（如添加脂肪酸和氨基酸）减少炎性介质的过量释放，对缓解仔猪免疫应激具有重要意义。

传统营养学认为天冬酰胺（Asn）是一种非必需氨基酸，但有研究表明，Asn 在调节机体免疫功能方面具有重要作用[2]。Wu 等[3]认为 Asn 是一种精氨酸（Arg）家族氨基酸，其在体内可以通过脱氨基和转氨基等一系列作用途径生成 Arg 和谷氨酰胺（Gln），而 Arg 和 Gln 在调节机体组织功能、缓解炎症方面发挥重要的作用。本实验室前期的研究也表明，Asn 可以缓解脂多糖（LPS）刺激导致的仔猪免疫应激和组织损伤[4]，而且可以改善 LPS 刺激仔猪受损肝脏的能量代谢[5]。下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴可以调节许多生理过程，如免疫、生育和机体的应激反应等[6]，在机体应激和感染中扮演着重要的角色[7]。LPS 可以刺激外周免疫细胞产生大量的炎性细胞因子，如 TNF-α、IL-1 和 IL-6 等[8]。而这些炎性细胞因子含量的升高会促使 HPA 轴活化，从而引起免疫应激反应[9-10]。而通过降低炎性细胞因子的营养调控方式可能有利于减轻由 LPS 刺激诱导的免疫应激[11]。因此，鉴于本实验室先前的研究结

果，推测在猪的饲粮中添加适量的 Asn，可能会缓解由 LPS 诱导的 HPA 轴炎症反应，从而缓解机体应激。

Toll 样受体 4（TLR4）是机体固有免疫的一个重要组成部分，其与髓样分化蛋白 88（MyD88）相互作用可启动核转录因子-κB（NF-κB）活化，后者可刺激炎性基因的表达，促进炎性细胞因子生成。同样的，核苷酸结合寡聚域受体（NOD）1 和 NOD2 也可以激活炎性细胞因子的释放。这些炎性细胞因子可以防止病原菌的入侵，但也可以导致宿主组织的损伤以及神经内分泌的紊乱。HPA 轴在机体应激和感染中扮演着重要的角色，LPS 刺激可以激活 HPA 轴中 TLR4 和 NOD 炎症信号通路，从而导致炎性因子如 TNF-α分泌量升高[12]。先前的研究表明，饲粮中添加鱼油可以通过抑制断奶仔猪 HPA 轴中 TLR4 和 NOD 炎症信号通路，降低炎性因子的分泌，从而缓解 LPS 刺激所导致的仔猪免疫应激反应[12]。但 Asn 对 HPA 轴 TLR4 和 NOD 信号通路的影响至今还未见报道。因此，本试验研究了 Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪的生长性能和 HPA 轴 TLR4 和 NOD 信号通路的影响，旨在为缓解仔猪免疫应激提供一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

Asn：有效成分>99.4%，购自武汉阿米诺科技有限公司。

1.2　试验动物与设计

试验选取 24 头健康的（21±2）日龄“杜×长×大”断奶仔猪[平均体重（8.12±0.56）kg]，按体重相近原则随机分为 4 组，分别为：1）对照组（基础饲粮）；2）LPS 组（基础饲粮+LPS）；3）LPS+0.5% Asn 组（基础饲粮+0.5%Asn+LPS）；4）LPS+1.0% Asn 组（基础饲粮+1.0% Asn+LPS）。每组 6 个重复，每个重复 1 头猪，试验期为 20 d。基础饲粮用丙氨酸

进行等氮处理。试验第 20 天，LPS 组、LPS+0.5% Asn 组和 LPS+1.0% Asn 组的试验猪注射 100 μg/kg BW 的 LPS（大肠杆菌血清型 055：B5，美国 Sigma 公司），对照组则注射等量的生理盐水。

1.3 试验饲粮

饲粮配制参照 NRC（1998）仔猪的营养需要，基础饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1 基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1 Composition and nutrient of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	55.50
豆粕 Soybean meal (44% CP)	22.00
麦麸 Wheat bran	3.00
鱼粉 Fish meal	5.50
玉米油 Corn oil	5.00
大豆浓缩蛋白 Concentrate soy protein	2.50
代乳粉 Milk-replacer powder	3.00
石粉 Limestone	0.70
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.00

食盐 NaCl	0.20
L-赖氨酸盐酸盐 *L*-Lys•HCl (78.8% Lys)	0.27
酸化剂 Acidifier	0.20
丁基化氢醌 Butylated hydroquinone	0.05
防腐剂 Preservative	0.05
糖精 Sweetener	0.03
预混料 Premix[1)]	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
消化能 DE/(MJ/kg)[2)]	14.00
粗蛋白质 CP	20.20
钙 Ca	0.90
总磷 TP	0.70
赖氨酸 Lys	1.35
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.72
天冬氨酸+天冬酰胺 Asp+Asn	1.69

[1)]每千克预混料中含有 Contained the following per kg of the premix：视黄醇乙酸酯 retinol acetate 2 700

μg，胆钙化醇 cholecalciferol 62.5 μg，*DL*-α-生育酚乙酸酯 *DL* -α-tocopheryl acetate 20 mg，甲萘醌 menadione 3 mg，VB_{12} 18 μg，核黄素 riboflavin 4 mg，烟酸 niacin 40 mg，泛酸 pantothenic acid 15 mg，胆碱氯化物 choline chloride 400 mg，叶酸 folic acid 700 μg，硫胺 thiamin 1.5 mg，吡哆醇 pyridoxine 3 mg，生物素 biotin 100 μg，Zn（$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$）80 mg，Mn（$MnSO_4 \cdot 5H_2O$）20 mg，Fe（$FeSO_4 \cdot H_2O$）83 mg，Cu（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$）25 mg，I （KI） 0.48 mg，Se （$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$） 0.36 mg。

[2)]计算值 Calculated values。

1.4 饲养管理

动物饲养试验在动物营养与饲料科学湖北省重点实验室进行。试验前清扫、冲洗栏舍，先用 2%氢氧化钠（NaOH）溶液冲洗栏舍，再用 1:200 的百毒杀稀释液喷洒猪舍，最后用福尔马林和高锰酸钾熏蒸数小时，净化 1 周。试验仔猪饲养在 1.80 m×1.10 m 不锈钢饲养笼中，饲养期间猪舍温度保持在 25 ~27 ℃，每天光照 12 h，自由通风，自由采食和饮水。

1.5 样品采集与处理

试验期每天记录仔猪的采食量，并分别在试验第 1 天和第 19 天对试验猪进行空腹 12 h 称重，计算平均日增重、平均日采食量和料重比。试验第 19 天，在注射 LPS 或生理盐水前 12 h，禁食，注射 4 h 后，屠宰全部试验猪，并取出下丘脑、垂体及肾上腺，用冰生理盐水冲洗后置于速冻管，并立即放入液氮进行速冻，-80 ℃冻存待测。

1.6 检测指标及方法

将组织样品溶解于装有 1mL RNAiso Plus 试剂（Takara，宝生物工程（大连）有限公司）的离心管中，放置冰上匀浆后，按说明书进行样品总 RNA 提取。

cDNA 合成按照 PrimeScript® RT reagent kit with gDNA eraser[Takara，宝生物工程（大连）

有限公司]规定的步骤完成。反转录体系为：4 μL 5×PrimeScript® Buffer，1 μL PrimeScript® RT enzyme mix，1.0 μL RT primer mix，10 μL DNAase 处理 RNA，加 RNase free dH_2O 至 20 μL。反转录参数：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，4 ℃至结束。

实时荧光定量 PCR 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)[real-time PCR 试剂盒，Takara，宝生物工程（大连）有限公司]方法步骤完成。20 μL 反应体系是由 10.0 μL SYBR® Premix Ex Taq™（2×）、0.4 μL ROX reference dye Ⅱ（10×）、2.0 μL cDNA、6.8 μL RNase free dH_2O、0.4 μL 上游引物（10 μmol/L）、0.4 μL 下游引物（10 μmol/L）组成。使用 ABI 7500 Real-time PCR 仪（Applied Biosystems 公司）进行扩增，PCR 反应条件为 95 ℃ 30 s；随后进行 95 ℃ 5 s，60 ℃ 34 s，40 个循环。内参基因为甘油醛-3-磷酸脱氢酶（*GADPH*），并采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 方法分析基因相对表达量[13]。

利用 Primer Premier 5.0 软件设计试验所用特异性引物，并由宝生物工程（大连）有限公司合成，相关基因的引物序列见表 2。

表 2　基因的引物序列

Table 2　Primer sequences of genes

基因 Gene	上游引物 Forward primers (5'-3')	下游引物 Reverse primers (5'-3')	扩增效率 Amplification efficiency/%	扩增长度 Product length/bp	登录号 Accession numbers
Toll样受体4 *TLR*4	TCAGTTCTCACCTTCCTCCTG	GTTCATTCCTCACCCAGTCTTC	96	166	GQ503242.1
髓样分化蛋白88 *MyD*88	GATGGTAGCGGTTGTCTCTGAT	GATGCTGGGGAACTCTTTCTTC	102	148	AB292176.1
白细胞介素-1受体相关激酶 *IRAK*1	CAAGGCAGGTCAGGTTTCGT	TTCGTGGGGCGTGTAGTGT	96	115	XM_003135490.1
肿瘤坏死因子受体相关因子6 *TRAF*6	CAAGAGAATACCCAGTCGCACA	ATCCGAGACAAAGGGGAAGAA	101	122	NM_001105286.1
核苷酸结合寡聚域受体1 *NOD*1	CTGTCGTCAACACCGATCCA	CCAGTTGGTGACGCAGCTT	97	57	AB187219.1
核苷酸结合寡聚域受体2 *NOD*2	GAGCGCATCCTCTTAACTTTCG	ACGCTCGTGATCCGTGAAC	99	66	AB195466.1

受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 *RIP2*	CAGTGTCCAGTAAATCGCAGTTG	CAGGCTTCCGTCATCTGGTT	103	206	XM_003355027.1
核转录因子-κB *NF-κB*	AGTACCCTGAGGCTATAACTCGC	TCCGCAATGGAGGAGAAGTC	100	133	EU399817.1
肿瘤坏死因子-α *TNF-α*	TCCAATGGCAGAGTGGGTATG	AGCTGGTTGTCTTTCAGCTTCAC	100	67	NM_214022.1
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 *GAPDH*	CGTCCCTGAGACACGATGGT	GCCTTGACTGTGCCGTGGAAT	100	194	AF017079.1

1.7 统计分析

试验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行独立样本 t 检验和回归分析。t 检验分别用于 LPS 组与对照组相比较，以确定 LPS 刺激的效果；以及 LPS 组与 LPS+0.5% Asn 组相比较和 LPS 组与 LPS+1.0% Asn 组相比较，以确定添加 Asn 对 LPS 仔猪的影响。线性和二次曲线回归分析，用来确定饲粮中添加不同水平的 Asn（0、0.5%、1.0%）对 LPS 刺激仔猪的影响。统计数据采用平均值表示。以 $P\leq0.05$ 为差异显著标准 $0.05<P\leq0.10$ 为具有显著性趋势。

2 结 果

2.1 Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪生长性能的影响

由表 3 可知，与对照组相比，LPS 刺激以及饲粮中添加 Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪的生长性能没有显著影响（$P>0.05$）。

表 3 Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪生长性能的影响

Table 3 Effects of asparagine on growth performance of weaned piglets challenged by LPS

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value		
	对照 Control	LPS	LPS+0.5% Asn	LPS+1.0% Asn		P_1	P_2	P_3
平均日增重 ADG/(g/d)	477	459	492	525	46	0.698	0.479	0.170
平均日采食量 ADFI/(g/d)	733	741	703	759	61	0.900	0.550	0.785
料重比 F/G	1.53	1.64	1.43	1.45	0.11	0.405	0.107	0.128

P_1：对照组 vs LPS 组；P_2：LPS 组 vs 0.5% Asn 组；P_3：LPS 组 vs 1.0% Asn 组。

P_1: control group vs LPS group; P_2: LPS group vs 0.5%Asn group; P_3: LPS group vs 1.0%Asn

group.

2.2 Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪下丘脑中 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因 mRNA 表达的影响

由表 4 可知，与对照组相比，LPS 可以显著提高下丘脑中 *TLR*4、*MyD*88、*NOD*2、受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2（*RIP*2）和 *NF-κB* 的 mRNA 表达量（P<0.05）。饲粮中添加 Asn 可以显著降低下丘脑中 *NF-κB* 的 mRNA 表达量（线性，P<0.05），有降低下丘脑中白细胞介素-1 受体相关激酶 1（*IRAK*1）的 mRNA 表达量的趋势（线性，P<0.10）。

表 4　Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪下丘脑中 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因 mRNA 表达的影响

Table 4　Effects of asparagine on key genes mRNA expression in TLR4 and NOD signaling pathways in hypothalamus of weaned piglets challenged by LPS

项目 Items	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value		
	对照组 Control	LPS	LPS+0.5% Asn	LPS+1.0% Asn		P_1	线性 Linear	二次 Quadratic
Toll 样受体 4 *TLR*4	1.00	2.71	2.17	3.02	0.44	0.001	0.903	0.312
髓样分化蛋白 88 *MyD*88	1.00	1.96	1.79	2.01	0.20	0.004	0.941	0.538
白细胞介素-1 受体相关激酶 *IRAK*1	1.00	1.13	1.02	1.02	0.06	0.175	0.052	0.172
肿瘤坏死因子受体相关因子 6 *TRAF*6	1.00	1.27	1.26	1.14	0.10	0.124	0.889	0.991
核苷酸结合寡聚域受体 1 *NOD*1	1.00	1.48	1.61	1.55	0.16	0.058	0.702	0.653
核苷酸结合寡聚域受体 2 *NOD*2	1.00	1.37	1.41	1.28	0.15	0.041	0.974	0.301

受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 *RIP*2	1.00	1.93	1.94	1.90	0.20	0.002	0.391	0.623
核转录因子-κB *NF-κB*	1.00	1.35	1.23	1.19	0.09	0.026	0.045	0.153
肿瘤坏死因子-α *TNF-α*	1.00	1.65	1.81	1.70	0.47	0.155	0.642	0.813

P_1：对照组 vs LPS 组。下表同。

P_1: control group vs LPS group. The same as below.

2.3　Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪垂体中 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因 mRNA 表达的影响

由表 5 可知，与对照组相比，LPS 可以显著提高垂体中 *TLR*4、*MyD*88、*NOD*1、*NOD*2、*RIP*2、*NF-κB* 和 *TNF-α*的 mRNA 表达量（$P<0.05$）。饲粮中添加 Asn 可以显著降低垂体中肿瘤坏死因子受体相关因子 6（*TRAF*6）的 mRNA 表达量（二次，$P<0.05$），提高了垂体中 *NOD*1 的 mRNA 表达量（线性，$P<0.10$；二次，$P<0.05$）。

表 5　Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪垂体中 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因 mRNA 表达的影响

Table 5　Effects of asparagine on key genes mRNA expression in TLR4 and NOD signaling pathways in pituitary gland of weaned piglets challenged by LPS

项目 Items	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value		
	对照 Control	LPS	LPS+0.5% Asn	LPS+1.0% Asn		P_1	线性 Linear	二次 Quadratic
Toll 样受体 4 *TLR*4	1.00	1.93	1.71	1.95	0.12	<0.001	0.88	0.536
髓样分化蛋白 88 *MyD*88	1.00	3.29	2.67	4.12	0.37	<0.001	0.566	0.175
白细胞介素-1 受体相关激酶 *IRAK*1	1.00	1.13	0.94	0.98	0.07	0.085	0.418	0.458
肿瘤坏死因子受体相关因子 6 *TRAF*6	1.00	1.18	1.00	1.18	0.07	0.110	0.866	0.042
核苷酸结合寡聚域受体 1 *NOD*1	1.00	1.76	1.96	2.23	0.20	0.001	0.089	0.046
核苷酸结合寡聚域受体 2 *NOD*2	1.00	3.86	4.37	4.65	0.38	<0.001	0.162	0.312

受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 *RIP*2	1.00	2.64	2.26	3.07	0.30	<0.001	0.515	0.132
核转录因子-κB *NF-κB*	1.00	1.93	1.64	1.94	0.11	<0.001	0.678	0.517
肿瘤坏死因子-α *TNF-α*	1.00	5.30	5.14	4.24	1.32	<0.001	0.252	0.329

2.4 Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪肾上腺中 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因 mRNA 表达的影响

由表 6 可知，与对照组相比，LPS 可以显著提高肾上腺中 *TLR*4、*MyD*88、*IRAK*1、*NOD*2、*RIP*2、*NF-κB* 和 *TNF-α*的 mRNA 表达量（P<0.05）。饲粮中添加 Asn 有降低肾上腺中 *TLR*4 和 *NOD*2 的 mRNA 表达量的趋势（线性，P<0.10），显著增加了肾上腺中 *RIP*2 的 mRNA 表达量（线性，P<0.05；二次，P<0.05）。

表 6　Asn 对 LPS 刺激断奶仔猪肾上腺中 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因 mRNA 表达的影响

Table 6　Effects of asparagine on key genes mRNA expression in TLR4 and NOD signaling pathways in adrenal gland of weaned piglets challenged by LPS

项目 Items	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value		
	对照 Control	LPS	LPS+0.5% Asn	LPS+1.0% Asn		P_1	线性 Linear	二次 Quadratic
Toll 样受体 4 *TLR*4	1.00	4.23	2.82	2.61	0.50	0.001	0.077	0.211
髓样分化蛋白 88 *MyD*88	1.00	2.96	2.02	2.42	0.25	<0.001	0.276	0.296
白细胞介素-1 受体相关激酶 *IRAK*1	1.00	2.00	2.55	2.04	0.27	0.004	0.336	0.254
肿瘤坏死因子受体相关因子 6 *TRAF6*	1.00	1.20	0.97	1.07	0.10	0.184	0.357	0.614
核苷酸结合寡聚域受体 1 *NOD*1	1.00	1.20	1.13	1.14	0.16	0.318	0.817	0.819
核苷酸结合寡聚域受体 2 *NOD*2	1.00	3.47	2.11	2.24	0.41	<0.001	0.069	0.111

受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 *RIP*2	1.00	4.87	6.71	8.74	1.08	<0.001	0.001	0.004
核转录因子-κB *NF-κB*	1.00	1.40	1.44	1.70	0.08	0.001	0.571	0.072
肿瘤坏死因子-α *TNF-α*	1.00	3.16	2.10	2.66	1.13	0.001	0.595	0.759

22

3 讨 论

免疫应激在养猪生产中普遍存在，是导致猪生长抑制的重要因素之一，给养猪生产造成很大的经济损失。免疫应激是由于饲养环境中的病原体或非病原体（如细菌、病毒和内毒素等）或疫苗接种等应激猪的免疫系统所致[14]。在免疫应激高度激活状态下，会导致炎性细胞因子过量分泌，从而产生免疫应激问题。传统的观点认为，炎性细胞因子主要由免疫系统产生。然而近几年的研究发现，神经内分泌系统、胃肠道、肝脏、肌肉和脂肪等组织也能分泌炎性细胞因子[15-17]。这些细胞因子通过对靶组织的直接作用或通过作用于神经内分泌系统，引起动物一系列行为和代谢上的改变，最终导致动物生长迟缓和胴体品质下降[14]。因此，采取一定措施适度调节应激动物过度的免疫反应，尤其是炎性细胞因子的过量产生对缓解免疫应激有重要作用。

近年来，通过营养调控来缓解免疫应激已成为动物营养学的重要研究方向。国内外学者和项目组在这方面进行了一系列的研究，发现 n-3 多不饱和脂肪酸（PUFA）、Arg 和共轭亚油酸等营养素均可缓解猪的免疫应激[15-19]。然而，由于免疫应激的调控机制尚不清楚，使得营养调控措施针对性不强。

Toll 样受体（TLRs）属于模式识别受体（pattern recognition receptors，PRR）家族，可通过识别病原相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns，PAMPs），在抗菌和激活机体固有免疫反应中发挥关键作用[20-21]。TLRs 家族中的 TLR4 可以识别 LPS 进而介导机体的炎症反应，主要是通过 TLR4 传递由 MyD88、IRAK1 和 TRAF6 级联传递的信号，并最终触发 NF-κB 的激活，活化的 NF-κB 刺激炎性基因的表达，促进促炎性细胞因子生成等。近年来发现，许多疾病的发病机制与 TLRs 信号通路的过度激活密切相关[22]。TLR4 信号通路的激活也是导致猪免疫应激的重要原因[15-18]。因此，有效抑制 TLR4 信号通路，对缓解仔猪免疫应激具有很重要的实际意义。在本试验中，与对照组相比，LPS 提高了下丘脑、垂体、

肾上腺中 *TLR*4、*MyD*88、*NF-κB* 的 mRNA 表达量及肾上腺中 *IRAK*1 的 mRNA 表达量，表明 LPS 刺激导致了下丘脑、垂体和肾上腺 TLR4 信号通路的激活。而饲粮中添加 Asn 降低了下丘脑中 *IRAK*1、肾上腺中 *TLR*4 和垂体中 *TRAF*6 的 mRNA 表达量，这说明 Asn 可能抑制了肾上腺 TLR4 上游信号通路，但对下丘脑和垂体，则是抑制了其 TLR4 下游信号通路。有研究表明，Arg 能缓解 LPS 刺激导致的断奶仔猪肝脏中 *TLR*4 的 mRNA 表达量增加[23]，而 Asn 是作为一种 Arg 家族氨基酸，其在体内可以通过脱氨基和转氨基等一系列作用途径生成 Arg[2]，因此，我们推测 Asn 可能在体内通过转化为 Arg 后，抑制 HPA 轴 TLR4 及其下游相关基因的表达，从而缓解 LPS 刺激导致的 HPA 轴炎症反应。此外，本试验结果表明，饲粮中添加 Asn 对垂体中 *TRAF*6 的 mRNA 表达量呈现二次趋势，即添加 0.5%的 Asn 比添加 1.0%的 Asn 可以更好地抑制垂体中 TLR4 受体信号通路下游基因的表达。先前的研究表明，Asn 可以通过降低肝脏中 *TLR*4、*IRAK*1、*TRAF*6、*NOD*1、*NOD*2 的 mRNA 表达量，从而缓解了 LPS 诱导的肝脏受损[24]，并改善了 LPS 诱导的损伤肠道的完整性[25]。因此，本研究结果表明，Asn 可能通过降低 *IRAK*1、*TLR*4 和 *TRAF*6 的 mRNA 表达量，从而缓解了 LPS 诱导的 HPA 轴的炎症反应。

除了 TLR4 信号通路之外，另一个 PRR 家族，即核苷酸结合寡聚化结构域蛋白（NODs），在识别 PAMPs 和调节宿主天然免疫反应中也起着关键作用[20-21]，但目前对 NOD 的研究，主要集中在 NOD1 和 NOD2。与 TLR4 类似，NOD1 和 NOD2 也可以通过衔接分子 RIP2 激活 NF-κB，导致促炎细胞因子基因 mRNA 的转录上调[21]。为了防止 NOD 信号通路的过度激活，使机体维持相对稳态，机体也存在 NOD1 和 NOD2 的负调控因子，适时终止 NOD 信号通路。目前已发现许多 NOD1 和 NOD2 的负调控因子，如 Erbb2 互作蛋白（ERBB2IP）和矢车菊苷β1（ACAP1）等[26-27]。在本试验中，与对照组相比，LPS 刺激提高了下丘脑中 *NOD*2、*RIPK*2、*NF-κB*，垂体中 *NOD*1、*NOD*2、*RIP*2、*NF-κB*，肾上腺中 *NOD*2、*RIPK*2、

NF-κB 的 mRNA 表达量，表明 LPS 刺激导致了 NOD 信号通路的激活。而饲粮中添加 Asn 降低了肾上腺中 *NOD*2 和下丘脑中 *NF-κB* 的 mRNA 表达量。但饲粮中添加 Asn 也同时提高了肾上腺中 *RIP*2 的 mRNA 表达量，且饲粮中添加 Asn 还有提高肾上腺中 *NF-κB* 的 mRNA 表达量的趋势。皮定安[28]研究发现，LPS 刺激降低了肝脏 *ACAP*1 的 mRNA 表达量。这表明，LPS 刺激造成过度炎症反应的同时会降低部分负调控因子的表达。同理，饲粮中 Asn 的添加水平过高也可能会抑制 NOD 信号通路中的负调控因子的表达，从而导致 *NF-κB* 的 mRNA 表达量升高。RIP2 是 NODs 信号通路上游因子，是 NOD1 和 NOD2 与下游因子 NF-κB 之间的衔接因子。在本研究中，饲粮中添加 Asn 虽然提高了肾上腺中 *RIP*2 的 mRNA 表达量，但对下游因子 *NF-κB* 的 mRNA 表达量基本没有影响。

4　结　论

Asn 虽然对 LPS 刺激仔猪的生长性能没有影响，但其可能通过降低下丘脑中 *NF-κB* 的 mRNA 表达量，而对下丘脑 TLR4 信号通路具有一定的抑制作用。

参考文献：

[1]　CHEN F,LIU Y L,ZHU H L,et al.Fish oil attenuates liver injury caused by LPS in weaned pigs associated with inhibition of TLR4 and nucleotide-binding oligomerization domain protein signaling pathways[J].Innate Immunity,2013,19(5):504–515.

[2]　LI P,YIN Y L,LI D F,et al.Amino acids and immune function[J].British Journal of Nutrition,2007,98(2):237–252.

[3]　WU G Y,BAZER F W,DAVIS T A,et al.Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production[J].Livestock Science,2007,112(1/2):8–22.

[4] 李爽.天冬酰胺对脂多糖刺激断奶仔猪肠道损伤的调控作用[D].硕士学位论文.武汉:武汉轻工大学,2013.

[5] KANG P,LIU Y L,ZHU H L,et al.The effect of dietary asparagine supplementation on energy metabolism in liver of weaning pigs when challenged with lipopolysaccharide[J].Asian-Australasian Journal Animal Science,2018,31(4):548–555.

[6] DEMORROW S.Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and disease[J].International Journal of Molecular Sciences,2018,19(4):986.

[7] HADDAD J J,SAADÉ N E,SAFIEH-GARABEDIAN B.Cytokines and neuroimmune-endocrine interactions:a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis[J].Journal of Neuroimmunology,2002,133(1/2):1–19.

[8] JACOBI S K,GABLER N K,AJUWON K M,et al.Adipocytes,myofibers,and cytokine biology:new horizons in the regulation of growth and body composition[J].Journal of Animal Science,2006,84(Suppl.13):E140–E149.

[9] CHESNOKOVA V,MELMED S.Minireview:neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules[J].Endocrinology,2002,143(5):1571–1574.

[10] LEONARD B E.The HPA and immune axes in stress:the involvement of the serotonergic system[J].European Psychiatry,2005,20(Suppl.3):S302–S306.

[11] LIU Y L,SHI J X,LU J,et al.Up-regulated expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of weaned pigs after *Escherichia coli*

lipopolysaccharide challenge[J].The Veterinary Journal,2010,184(2):230–235.

[12] LIU Y L,CHEN F,LI Q,et al.Fish oil alleviates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis associated with inhibition of TLR4 and NOD signaling pathways in weaned piglets after a lipopolysaccharide challenge[J].The Journal of Nutrition,2013,143(11):1799–1807.

[13] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J].Methods,2001,25(4):402–408.

[14] GABLER N K,SPURLOCK M E.Integrating the immune system with the regulation of growth and efficiency[J].Journal Anima Science,2008,86(Suppl.14):E64–E74.

[15] LIU Y L,CHEN F,ODLE J,et al.Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge[J].The Journal of Nutrition,2012,142(11):2017–2024.

[16] AMMERDORFFER A,SCHOFFELEN T,GRESNIGT M S,et al.Recognition of *Coxiella burnetii* by Toll-like receptors and NOD-like receptors recognition of *C. burnetii* by TLRs and NLRs[J].Journal of Infectious Diseases,2014,211(6): 1027–1034.

[17] LIU Y L,CHEN F,ODLE J,et al.Fish oil increases muscle protein mass and modulates Akt/FOXO,TLR4,and NOD signaling in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge[J].The Journal of Nutrition,2013,143(8):1331–1339.

[18] LIU Y L,GONG L M,LI D F,et al.Effects of fish oil on lymphocyte proliferation,cytokine production and intracellular signalling in weanling pigs[J].Archives of Animal

Nutrition,2003,57(3):151–165.

[19] LIU Y L,LI D F,GONG L M,et al.Effects of fish oil supplementation on the performance and the immunological,adrenal,and somatotropic responses of weaned pigs after an *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge[J].Journal of Animal Science,2003,81(11):2758–2765.

[20] FUKATA M,VAMADEVAN A S,ABREU M T.Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders[J].Seminars in Immunology,2009,21(4):242–253.

[21] TAKEUCHI O,AKIRA S.Pattern recognition receptors and inflammation[J].Cell,2010,140(6):805–820.

[22] DE NARDO D.Toll-like receptors:activation,signalling and transcriptional modulation[J].Cytokine,2015,74(2):181–189.

[23] 车政权.精氨酸对脂多糖刺激仔猪肝脏损伤的缓解作用及其机理[D].硕士学位论文.武汉:武汉工业学院,2010.

[24] WU H T,LIU Y L,PI D A,et al.Asparagine attenuates hepatic injury caused by lipopolysaccharide in weaned piglets associated with modulation of Toll-like receptor 4 and nucleotide-binding oligomerisation domain protein signalling and their negative regulators[J].British Journal of Nutrition,2015,114(2):189–201.

[25] CHEN S K,LIU Y L,WANG X Y,et al.Asparagine improves intestinal integrity,inhibits TLR4 and NOD signaling,and differently regulates p38 and ERK1/2 signaling in weanling

piglets after LPS challenge[J].Innate Immunity,2016,22(8):577–587.

[26] MCDONALD C,CHEN F F,OLLENDORFF V,et al.A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-κB signaling[J].Journal of Biological Chemistry,2005,280(48):40301–40309.

[27] EITEL J,KRÜLL M,HOCKE A C,et al.β-PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2[J].The Journal of Immunology,2008,181(4):2664–2671.

[28] 皮定安.天冬酰胺对脂多糖诱导的仔猪肝脏损伤和肌肉蛋白质降解的调控作用[D].硕士学位论文.武汉:武汉轻工大学,2014.

[29] WANG X Y,LIU Y L,WANG S H,et al.Asparagine reduces the mRNA expression of muscle atrophy markers via regulating protein kinase B (Akt),AMP-activated protein kinase α,toll-like receptor 4 and nucleotide-binding oligomerisation domain protein signalling in weaning piglets after lipopolysaccharide challenge[J].British Journal of Nutrition,2016,116(7):1188–1198.

Effects of Asparagine on Growth Performance and Toll-Like Receptor 4 and Nucleotide Binding Oligomerization Domain Signaling Pathways of Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis of Weaned Piglets Challenged by Lipopolysaccharide

CHEN Huifu PI Dingan LENG Weibo WANG Xiuying ZHU Huiling LIU Yulan KANG Ping*

(*Hubei Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Wuhan Polytechnic University, Wuhan* 430023, *China*)

Abstract: This study was conducted to investigate the effect of asparagine (Asn) on growth performance and key gene mRNA expression in toll like receptor 4 (TLR4) and nucleotide binding oligomerization domain (NOD) signal pathways of the hypothalamus-hypophysis-adrenal (HPA) axis of weaned piglets challenged by lipopolysaccharide (LPS). Twenty-four healthy (21+2)-old-day weaning piglets (Duroc×Landrace×Yorkshire) with the body weight of (8.12+0.56) kg were selected and randomly divided into 4 groups: 1) control group (basal diet), 2) LPS group (basal diet+LPS); 3) LPS+0.5% Asn group (basal diet +0.5% Asn+LPS); 4) LPS+1% Asn group (basal diet+1.0% Asn+LPS). There were 6 replicates in each group and 1 pig in each replicate. On day 20, pigs in LPS group, LPS+0.5% Asn group and LPS+1% Asn group were injected with 100 μg/kg BW LPS, and pigs in the control group were injected with the same amount of saline. The experiment lasted for 20 days. The results showed that compared with the control group, LPS challange and dietary Asn supplementation had no effects on the growth performance of weaned

*Corresponding author, associate professor, E-mail: ylkp2003@163.com (责任编辑 武海龙)

piglets challenged by LPS (*P*>0.05). LPS challenge significantly increased the mRNA expression of *TLR*4, myeloid differentiation factor 88 (MyD88), *NOD*2, receptor-interacting protein serine/threonine kinases 2 (*RIP*2) and nuclear factor-κB (*NF-κB*) mRNA expression in the HPA axis (*P*<0.05). Dietary Asn supplementation could significantly decrease the mRNA expression of *NF-κB* in hypothalamus (linear, *P*<0.05), and had a tendency to decrease the mRNA expression of *TLR*4 and *NOD*2 in adrenal (linear, *P*<0.10). In addition, dietary Asn supplementation decreased the mRNA expression of tumor necrosis factor-associated factor 6 (*TRAF*6) in hypophysis (linear, *P*<0.05), and significantly increased the mRNA expression of *RIP*2 in adrenal (linear, *P*<0.05; quadratic, *P*<0.05). The results suggest that although Asn have no effects on the growth performance of weaned piglets challenged by LPS, it could inhibit TLR4 signal pathway via decreasing the mRNA expression of NF-κB in hypothalamus.

Key words: asparagine; lipopolysaccharide; weaned piglets; hypothalamus-hypophysis-adrenal axis; TLR4; NOD